犬の伝染性肝炎に関する研究

II. 日本における本病の分布とその免疫について

佐々木文存・中井正久・岩本市蔵

(微生物化学研究所)

小西信一郎・池上竹二

(東京大学農学部獣医学科細菌学教室)

(昭和 31 年 10 月 10 日受付)

I. 緒 言

犬の伝染性肝炎の日本における発生・流行について、我々⁸⁾は初めてその病原ウイルスを確認して報告した。我々が犬に伝達し得たウイルスは、症候学的、病理組織学的、ウイルス学的に RUBARTH¹²⁾が報告し、後に世界各地で観察されている犬伝染性肝炎ウイルスと全く同一のものであることを認めた。

犬伝染性肝炎がわが国に存在することは、我々が認めた東京都の例の外に、北海道で藤本ら⁴⁾および平戸ら(昭和 30 年 4 月日本獣医学会講演)、大阪で望月ら(昭和 30 年 月日本獣医学会示説)の病理学的検査例によつても明らかであり、その浸潤度はかなり高いようである。

本病の潜在感染については、既に PARRY⁹⁾, LARIN⁶⁾, DECAMP³⁾ らによつて指摘されているが、その分布については RUBARTH¹²⁾ が本病の実験的感染犬 49 例について、その感染犬の肝組織を抗原とした補体結合反応が診断的意義を有することを認めて以来、LEHNERT⁷⁾, BRUNNER et al²⁾, BAKER¹⁾ 等がそれぞれ補体結合抗体の検出率によつて類推し報告しており、この問題は、流行病学的並に免疫学的な見地から極めて興味あるものである。

我々は、日本各地から蒐集した血清について補体結合抗体を測定し、本病の特異抗体の分布と、犬の感受性について、その病原ウイルスとの関連性を実験的に検討することを企図した。

次に、犬伝染性肝炎ウイルスの免疫学的諸性状のうち、不活化ウイルスの免疫原性、およびその特異免疫血清の犬における感染防禦力はかなり高度なものとせられている。(FLINT⁵⁾, DECAMP³⁾ 等)。我々も、犬に継代しつゝある“D 43”系ウイルスを供試して実験したので、これらについて今迄に得た成績を報告する。

II. 日本における犬伝染性肝炎の分布

Table 1 に示した如く、日本各地から蒐集した血清について、補体結合反応を行い、抗体分布を調査した。

Table 1.

地 域	例 数	陽性数	陽性率 (%)
東 京	155	58	37.4
愛 知	13	5	38.5
長 野	16	4	25.0
三 重	10	2	20.0
京 都	97	4	4.1
岡 山	10	1	10.0
愛 媛	8	0	0
高 知	20	2	10.0

補体結合反応の抗原は“D 43”株ウイルス感染肝から RUBARTH¹²⁾の方法に従つて作製し、供試血清は採取後凍結保存したものを使用時 56°C 30 分加熱非働化した。反応の術式はアメリカ陸軍々医学校法に準じ、血清階段稀釈 0.25 cc, 抗原 2 単位 0.25cc, 補体 2 充単位 0.5 cc を混和し 4°C で 16~18 時間おいてから 3% 感作羊血球 0.5 cc を加え、よく振盪した後、38°C に 30 分おいて溶血を読む方法である。反応の読みは 1:8 稀釈以上で抗体価 +₂ (50% 溶血阻止) を示したものを陽性とした。

検査総数 329 例中、陽性のものは 76 例で、その陽性率は 23.4% であつた。各地域ごとの陽性率は最低 0% から最高 38.5% に至るかなり大幅の差があり、概観して中部以東では比較的高率を示し、京都以西は低率であつた。

III. “D 43”系ウイルスによる犬の感染試験

この実験は東京と京都の二つの試験地で、その地

Table 2. HCC-D 43 株による感染試験

試験地	(註 1) 併試犬例数	感染したもの (註 2)		(註 3) 感染しないもの	感染率 (%)	斃死率 (%)	試験期間
		斃死	耐過				
東京	31	13	8	10	67.7	41.8	1955 年
京都	34	26	6	2	94.1	76.5	1955 年 8 月— 1956 年 3 月

(註 2): 一般症状, 体温, 白血球数, 剖検所見 (一般及び封入体), 接種前後の C. F. T. 等のうち, 全部若しくはその大部分の結果を総合して感染と認定した。

(註 3): 上と同様の試験の結果異常を認めなかつたもの。

域から蒐集したほとんど野犬に近い抑留犬について行つた。

供試したウイルスは, “D 43” 系ウイルスで, その静脈内注射によつて感染斃死した犬の肝組織の Hartley ブイヨン加 20% 乳剤 (3,000 r. p. m. 5 分間遠心した上清) である。接種方法は, 上記ウイルス浮游液 5.0 cc を静脈内に注射する方法と, 0.1 cc を前眼房内に注射する方法との二つによつた。

供試犬は生後 1 ヶ月以上 6 ヶ月以内, 体重 2.0~8.0 kg のもので, いずれも使用前に視診, 白血球数測定によつて異常なきことを確かめ, かつその血清中に本ウイルスに対する補体結合抗体を有しないことを確認した。供試例数は東京地域で集められたもの 31 頭, 京都地域で集められたもの 34 頭であつた。接種後視診, 白血球数の測定を行い, 斃死したものについては病理解剖学的並びに病理組織学的の検査を行つた。

その結果を Table 2 に総括する。即ち東京例では感染率 67.7%, 斃死率 41.8%, 京都例では感染率 94.1%, 斃死率 76.5% を示した。 χ^2 検定法¹⁴⁾によつて検定すると, この差は 99% 以上の信頼度において有意であるといえる。即ちこの両地域の犬は本ウイルスに対する感受性を異にすることが認められる。

IV. 本ウイルスの免疫学的性状

1. 不活化ウイルスの免疫原性

免疫原としては, フォルマリンで不活化されたウイルスを用いた。原ウイルス材料は “D 43” 株を注射されて, 定型的に発病斃死した犬の肝臓の 10% 乳剤 (以下 V. No. 1 と略記) 及び 20% 乳剤 (以下 V. No. 3 と略記) である。これにフォルマリンを 0.2% の割に加え, 25°C に 10 日間以上放置して不活化をはかつた。更にこれに Thimerosal “Takeda” を 1:10,000 に添加した。この不活化ウイル

スは, その 5.0 cc を健康犬の静脈内に, 或は 20.0 cc をその皮下に注射しても, 見掛け上何らの障害をも来さなかつた。

供試犬は予め詳細に検査し, 本病感染を否定し得たもののみである。これを 3 群に分ち, 第 1 群には上記不活化ウイルス乳剤の 3.0 cc, 第 2 群には 5.0 cc を夫々皮下注射し, 第 3 群は無処置対照とした。

免疫注射後, 臨床検査, 白血球数計測を毎日行い, 7 日, 17 日, 21 日後に補体結合抗体価を測定し, 21 日後には約 10,000 MLD の生ウイルスを静脈内注射して攻撃を行つた。攻撃後 14 日間是一般臨床状態, 白血球数を検査し, 11 日, 14 日後に補体結合抗体価を測定し, 斃死したものは剖検した後, 病理組織学的, 細菌学的検査を行つた。その成績を総括すると Table 3 に示す通りである。Table 3 を通覧すると, フォルマリン不活化ウイルスを注射された犬は, 注射後何等の異状を呈せず, 血清中に補体結合抗体の産生が認められた。而も生ウイルスの攻撃に対して全例が耐過した。但しウイルス含有濃度の低い場合 (V. No. 1 群) は, 生ウイルスによる攻撃の後, かなりの異状を臨床的に現わし, 白血球数の減少を示したものがあつた。之に対しウイルス含有濃度の高い場合 (V. No. 3 群) においては全くかような異状を示さなかつた。たゞ, この中の 1 例は死亡したが, この例は剖検上伝染性肝炎の所見がなく, 組織学的にも特有の核封入体を認めず, むしろデステンパーと思われる像が観察され, かつ臓器から *Salmonella typhi-murium* が分離された。

対照群は生ウイルスの注射によつて全例共本病に特有の臨床症状を呈して死亡し, 病理解剖学的, 組織学的にも犬伝染性肝炎の定型的な所見が認められた。

2. 抗ウイルス免疫血清の感染防禦能

この実験に使用した抗ウイルス免疫血清は, “D 43” 株ウイルスの接種後感染耐過した犬, 或は前記フォルマリン加不活化ウイルスで前処置後, 生ウイ

Table 3.

試験群	供試犬 例数	不活化ウイルスの 種類と接種方法	不活化ウイルス注射後の所見			生ウイルスによる 攻撃までの期間	生ウイルスで攻撃後の状態			定型的死数 耐過生存数
			臨床観察	白血球数	CFT		臨床観察	白血球数	CFT	
1	6	3 V No. 1 3.0 cc	0	0	+ ₃	21 日	3	1	+ ₃	0/3
		3 V No. 3 皮下注射	0	0			0	0		0/3
2	11	5 V No. 1 5.0 cc	0	0	+ ₅	〃	3	0	+ ₅	0/5
		6 V No. 3 皮下注射	*1	0			*1	0		0/5(*1)
3	7	無処置対照					7	5		7/0

- 註 1. 臨床観察は体温及び一般臨床検査によつて犬伝染性肝炎症状を呈したものの、白血球数は 10,000/1 mm³ 以下を示したもの、CFT は補体結合抗体の発現をみたもので、それぞれの数字はその例数である。
2. 定型的死数は臨床、白血球数、剖検所見、封入体を検査して犬伝染性肝炎を確認したもの。
3. (*1) は本病以外で死亡した例を示す。

ルスをくりかえし大量に注射して免疫された犬から採取したものである。可及的力価を一定にする為、3 乃至 4 頭の犬の血清を混合して用いた。保存の目的で Thimerosal “Takeda” を 1:10,000 の割に添加した。

供試犬は 5~9 kg で、使用前に前実験と同様な予備的検査を施したものである。実験は 2 回に亘つて行われた。

第 1 回の実験では 7 頭の犬を用い、之を 3 群 (3 頭, 2 頭, 2 頭) に分ち、約 1,000 MLD の生ウイルス注射した直後に、抗ウイルス免疫血清を体重 kg 当り夫々 1.0 cc, 2.0 cc 及び 4.0 cc を静脈内注射した。第 2 回実験では 2 頭の犬について生ウイルス注射後、臨床症状が顕著に現われた時期に免疫血清 2.0 cc を、同じく静脈内に注射した。対照犬は生ウイルス注射後無処置のままにおいて観察した。その成績は Fig. 1. 及び Fig. 2. に示した通りである。

第 1 回実験では抗ウイルス血清体重 kg 当り 1.0 cc を注射した群において軽度の食欲不振、発熱があつたが、白血球の減少は認められなかつた。その中の 1 例は神経症状を發して死亡したが、剖検並に病理組織学的所見上本病に特有の変状を認めず、かつ細菌検査も陰性であつた。抗ウイルス血清を体重 kg 当り 2.0 cc 及び 4.0 cc を注射した他の二群においては臨床所見、白血球数共に何等の異状なく経過した。

第 2 回実験では、抗ウイルス血清の注射後 1 例は急速に正常に復した。他の 1 例は一時症状が輕快し、白血球数も正常に復したが、角膜濁濁、血便がみられた。

対照群の 4 例は、生ウイルス注射後 3~7 日の経過で、何れも定型的な症状を發して死亡した。

V. 考 察

我々は前報⁸⁾に引続き犬伝染性肝炎に関する研究を行い、今回は日本における本病の分布及び本病ウイルスの免疫学的性状について検討を進めた。

犬伝染性肝炎の補体結合抗体の分布について、LEHNERT⁷⁾ はスウェーデンで 229 頭を検査し、陽性 103 頭 (45 %), 疑陽性 26 頭 (11 %), 陰性 100 頭 (44 %) であつたと報告し、BRUNNER et al²⁾ がスイスの東部及び中部で調べた 300 例のうち 136 頭 (45 %) が陽性であつた。米国では BAKER¹⁾ はニューヨークで 50 % に、PRIER & KALTER¹¹⁾ は市街犬の 53.7 % に夫々補体結合抗体があることを認め、POPPENSIEK¹⁰⁾ も 50 % 程度の陽性率と記載している。これらの諸外国における報告に比較すると、日本における本病の分布は比較的低い状態にあることが示された。

諸外国では、一般に本病の感染乃至死亡率は高くないといわれている。BRUNNER et al²⁾ はチューリッヒで 300 例を検索して 16 頭 (5%) が本病で死亡したことを認め、SMITH¹³⁾ は野外例で死亡率が 10 % 以下であり、その実験例でも極めて低い死亡率を認めたのみであると報告し、BAKER¹⁾ は実験的には死亡率が 10% 以下であると記載している。これらの成績に対比して我々の実験における成績 (感染率 81.5%, 死亡率 60%) は著しく高率であつた。

次に本ウイルスの免疫学的性状に関して、その不活化ウイルスの抗原性と、抗ウイルス免疫血清の感染防禦能について実験した。その成績によると、不活化ウイルスはかなり強固な免疫を犬に附与し、又抗ウイルス犬免疫血清は明らかにウイルスの発病を阻止した。由来、犬伝染性肝炎の不活化ウイルスの免疫原性については種々実験されている。FLINT⁵⁾

Fig. 1

Fig. 2

はその不活化ウイルスワクチンは、デステンパーにおける LAIDLAW-DUNKIN ワクチンとほぼ同程度に有効であるといふ、その免疫血清は 18~21 日間本病の予防に有効であると述べ、DECAMP³⁾ も本病の肝組織不活化ワクチンは、その 1.0 cc の皮内注射で犬は免疫され、免疫血清の効力については、前者と同様な結果を報告している。しかし POPPENSIEK¹⁰⁾ は不活化ウイルスによる免疫は安全であるが、免疫期間が短く、且つ、その免疫血清はごく短い期間の免疫効力しか期待出来ないから、本病の免

疫は、免疫血清とウイルスの共同注射が最も効果的であると報告している。もつともこの場合には、免疫犬は尿中に 6 週間もウイルスを保有していて、これと同居させた無処置の健康犬が感染したので、この免疫方法によることは犬伝染性肝炎の Carrier を作るおそれがあるが、自然界における本病は同様に尿を通じて流行し、犬の間に広く分布しているから、この免疫方法が實際上重大な障害になることはないとして述べている。

しかし、我が国における犬伝染性肝炎の分布状態は諸外国に比して低く、犬の本病に対する感受性は高いので、その予防免疫の実施については甚だ意義あるものと思われる。

VI. 総 括

1) 我々は、日本の各地域から 329 例の犬血清を蒐集して、犬伝染性肝炎の補体結合抗体の分布を調査したが、その分布率は平均 23.4 % で、地域的に分布差がある。

2) この補体結合抗体の分布率から類推すると、我が国の犬伝染性肝炎の浸潤度は諸外国に比べると低い。

3) 補体結合抗体の分布率の高い地域(東京), 低い地域(京都)の犬について, その“D 43”系ウイルスに対する感受性を調べた結果, 両地域の犬の本病ウイルスに対する感受性には明らかに差があり, 而もかかる感受性の差は両地域における補体結合抗体の分布率と逆の関係にある傾向が認められた。

4) 本病ウイルスをフォルマリンで不活化したものは, 高度の免疫原性がある。本ウイルスに対する犬免疫血清は, 一定の条件の下において本病の発症を阻止し, 或は治癒せしめる能力がある。

稿を終るに臨み, 御指導並に本文御校閲を賜った越智教授に謝意を表し, 本実験に対して終始御助力を賜った山本教授および病理学教室員, 東京都衛生局獣医課の方々, 並に血清の蒐集に御協力を賜った各府県の関係者各位に深謝する。

文 献

- 1) BAKER, J. A.: *Proceedings Book, A. V. M. A., 87th Ann. Meeting*, 242 (1950).
- 2) BRUNNER, K. T., M. SCHEITLIN & H. STÜNZI: *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **93**, 443 (1951).
- 3) DECAMP, C. E.: *Vet. Med.*, **48**, 199 (1953).
- 4) FUJIMOTO, Y., M. OHBAYASHI & T. ONO: *Vet. Res.*, **1**, 125 (1953).
- 5) FLINT, J. C.: *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **122**, 110 (1953).
- 6) LARIN, N. M.: *Proc. of 15th Int. Vet. Cong.*, Part I (1953).
- 7) LEHNERT, E.: *Scand. Vet. Tidskr.*, **38**, 94 (1948).
- 8) OCHI, Y., S. KONISHI & S. YAMAMOTO, et al: *Zbl. Vet.-Med.*, **3**, 55 (1956).
- 9) PARRY, H. B. & N. M. LARIN: *Vet. Rec.*, **63**, 833 (1951).
- 10) POPPENSIEK, G. C.: *Proceedings Book, A. V. M. A., 89th Ann. Meeting*, 228 (1952).
- 11) PRIER, J. E. & S. S. KALTER: *Amer. J. Vet. Res.*, **16**, 429 (1955).
- 12) RUBARTH, S.: *Acta Path. et Microbio. Scand. Suppl.*, **69**, 1 (1947).
- 13) SMITH, D. L. T.: *Amer. J. Vet. Res.*, **12**, 38 (1951).
- 14) 増山: 小数例の纏め方と実験計画の立て方, 河出書房(昭和26年)

STUDIES ON INFECTIOUS HEPATITIS OF DOGS.

II. THE DISTRIBUTION OF THE DISEASE IN JAPAN, AND ITS IMMUNIZATION

Norimasa SASAKI, Masahisa NAKAI and Ichizo IWAMOTO

Micro-Biological Laboratory, Bio-chemical Co., Ltd., Kyoto

Shin-ichiro KONISHI and Takeji IKEGAMI

Department of Bacteriology, Division of Veterinary Science, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Tokyo

(Received for Publication Oct. 10, 1956)

Previously, the authors were the first to isolate the infectious canine hepatitis virus (H. c. c. virus), D 43 strain, and report that the disease existed in Japan. Thereafter, distribution of the disease and its immunization were studied, and the results obtained are as follows.

1. In various districts of Japan, 329 serums were collected from random street dogs, and the serological survey was made. Of these, 76 (23.4%) reacted positive

to H. c. c. by the complement fixation test, but this frequency took a wide range between 0 and 38.5 % in different districts. The high frequency of positive results showed that the disease was wide spread, but it also showed the distribution of this disease in Japan was either equal to, or lower than that in foreign countries.

2. In order to recognize the susceptibility of random street dogs to the "D 43" strain virus of the disease, the authors made comparison of cases occurring in a district showing high frequency (Tokyo, 37.4 %) with those occurring in one showing low frequency (Kyoto, 4.1 %).

The susceptibility of dogs in both districts showed a distinct difference in inverse proportion to the frequency of positive results shown by the complement fixation test, i. e. morbidity was 67.7 % and mortality was 41.8 % in Tokyo, where as it was 94.1 % and 76.5 % in Kyoto.

3. A vaccine was made from 10 % or 20 % emulsions of saline of liver from a dog which had developed typical symptoms and died of the infectious hepatitis virus (D 43 strain) infection. Formalin was added to the extent of 0.2 % and the mixture was kept at 25°C for 10 days or more. In use, the vaccine was injected subcutaneously in the proportion of 3 or 5 cc per kg of body weight, and 21 days later, 10,000 MLD of infectious hepatitis virus was inoculated to experimental dogs.

As to results, when given the vaccine made from 10 % suspension of liver, the dogs developed some symptom and leucopenia, but when given the vaccine made from 20 % suspension, the dogs showed elevated CF titre and no response.

4. Hyperimmune serums were obtained from dogs (convalescent or vaccinated) immunized by the repeated inoculation with a great volume of the virus.

The intravenous injection of serum, in the proportion of 2 or 4 cc per kg of body weight, protected dogs completely against 1,000 MLD of infectious hepatitis virus given immediately before the serum injection.

When experimental dogs developed infectious hepatitis after the injection of the virus, we injected a hyperimmune serum at the rate of 2 cc for kg of body weight. One recovered rapidly, but another turned only temporarily to normal as to symptoms and leucocyte count, while it showed corneal opacity and bloody feces.